



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

PROPRIEDADES REOLÓGICAS E DE ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DO FUCOPOL

Elsa de Fátima Soares da Silva Bastos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutor Victor Manuel Delgado Alves

Co-orientador: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo, Professora Associada do Instituto Piaget;

Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Victor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Cristiana Andreia Vieira Torres.

Lisboa, 2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Vítor Alves, por esta oportunidade, pela sua disponibilidade e por todo o apoio e conhecimento que me transmitiu.

À Cristiana Andreia Vieira Torres, agradeço toda a ajuda no desenho de experiências.

A todos colegas e funcionários do laboratório do Departamento Agro-Indústrias do ISA, pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Às minhas colegas de trabalho da Biovegetal, que sempre me ajudaram a conciliar o trabalho e o mestrado.

À minha família, em especial aos meus pais que sempre me incentivaram para a realização do mestrado e deste trabalho, e que me deram todas as condições para um futuro melhor.

Ao Rui, um obrigado especial por todo o apoio, carinho e a paciência.

RESUMO

Neste trabalho estudaram-se as propriedades reológicas em solução aquosa, designadamente a capacidade espessante, bem como a capacidade estabilizante de emulsões de óleo em água, de um polissacárido microbiano produzido pela bactéria *Enterobacter* A47 em caldo fermentativo rico em glicerol. Efectuaram-se diversos estudos, que permitiram conhecer o comportamento reológico do biopolímero sob diversas condições de pH e força iónica, bem como obter as condições óptimas para formação de emulsões estáveis, de óleo de girassol em água, e avaliar as suas características.

Verificou-se no estudo da capacidade espessante que o biopolímero apresenta um comportamento não-newtoniano reofluidificante e que o aumento da sua concentração em solução aumenta a sua viscosidade aparente. Através de um desenho experimental rotacional composto, estudou-se o efeito da força iónica (entre 0,15 e 0,75) e do pH (entre 3,47 e 10,54) na viscosidade aparente. A viscosidade do primeiro patamar Newtoniano atingiu valores mais elevados na gama de pH entre 3 e 8, e de força iónica entre 0,1 e 0,5 M.

A capacidade estabilizante do biopolímero na formulação de emulsões com óleo de girassol foi estudada usando soluções aquosas com 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de EPS, e razões óleo/água (O/A) de 20/80, 40/60, 60/40 e 80/20. Verificou-se que só com as soluções de polímero de 1,0% e 1,5% m/m, e para as proporções 20/80, 40/60 e 60/40, se conseguiu estabilizar completamente as emulsões, não havendo qualquer separação de fases.

Palavras-chave: Exopolissacárido, Glicerol, *Enterobacter* A47, Reologia, Emulsões

ABSTRACT

In this work, were studied the rheological properties in aqueous solution, namely the thickening ability and the ability of stabilizing oil in water emulsions, of an extracellular polysaccharide produced by the bacterial strain *Enterobacter* A47 from glycerol. Several studies were carried out, that enabled to evaluate the rheological behavior of the biopolymer under a wide range of pH and ionic strength values, as well as to obtain optimum conditions for the formation of stable sunflower oil/water emulsions.

It was observed that the biopolymer aqueous solutions have a non-Newtonian shear thinning behavior. By studying the thickening ability, it has been demonstrated that increasing the concentration of polymer in solution, the apparent viscosity increases. Through an experimental central composite rotatable design, it was studied the effect of ionic strength (between 0.15 and 0.75) and pH (between 3.47 and 10.54) on the apparent viscosity. The value of viscosity at the first Newtonian plateau reached higher values in the pH range between 3 and 8, and ionic strength between 0.1 and 0.5 M.

The ability of the biopolymer to stabilize sunflower oil/water emulsions was studied using aqueous biopolymer solutions with concentrations of 0.25%, 0.5%, 1.0% and 1.5% w/w, and ratios oil/water (O/A) of 20/80, 40/60, 60/40 and 80/20. It was observed that the polymer solutions of 1.0% and 1.5% w/w, and for oil/water ratios of 20/80, 40/60 and 60/40, were the ones producing stable emulsions without perceiving any phase separation.

Keywords: Extracellular polysaccharide, Glycerol, *Enterobacter* A47, Rheology, Emulsions.

EXTENDED ABSTRACT

Polysaccharides find application in several industrial areas, including food industry, mainly due to their rheological properties that allow the formation of viscous solutions at low concentrations and stability over wide temperature, pH and ionic strength ranges. Currently, polysaccharides obtained from plants (e.g. Arabic gum) and algae (e.g. alginate) still dominate the market, with microbial polysaccharides (e.g. xanthan gum, gellan, and bacterial alginate) representing only a small fraction of the biopolymers market, mainly due to their higher production costs.

A vast number of bacterial extracellular polysaccharides (EPS) have been reported, such as the biopolymer FucoPol synthesized by *Enterobacter* A47 in fermentation broth rich in glycerol. Glycerol is a byproduct of many industrial processes, mainly from biodiesel production, is generated in large quantities, far beyond current consumption in traditional applications, thus making it a residue. The use of glycerol as carbon source may contribute for the reduction of production costs, thus making the process more cost effective.

Polysaccharides are often added to the oil-in-water emulsions in order to provide texture and to improve emulsion stability. An emulsion is a dispersion of droplets of liquids that are not completely miscible and may exhibit structural changes in various ways depending on the characteristics of the system and conditions it is under. The ability of polysaccharides to stabilize emulsion droplets is attributed to their ability to increase the viscosity of the continuous phase or their ability to promote formation of a gel network in the aqueous medium. Rheological measurements provide information about viscosity and viscoelastic properties of polymer solutions and emulsions, as well as about the physical stability of the later.

The aim of this work is the evaluation of the thickening capacity and emulsion stabilizing ability of an exopolysaccharide (Fucopol) produced by *Enterobacter* A47 in a fermentation broth rich in glycerol. For this, were carried out several studies to observe and learn about rheological behavior of this biopolymer under several conditions as well as the optimal conditions to form stable emulsions and their characteristics. The biopolymer was dissolved in deionized water to obtain EPS at various concentrations to study its thickening capacity. A central composite

rotatable design was used to study the influence of pH and ionic strength on the apparent viscosity of the biopolymer solutions. In addition to this, was carried out a work with formation of several emulsions with sunflower oil and the EPS, to study the capacity of the biopolymer to stabilize those emulsions.

Through the study of the thickennig capacity it was verified that the biopolymer solutions have a shear thinning behavior. It was observed that the increase of the polymer concentration increased the viscosity. However, the apparent viscosity decreased over time periods above 24h.

Through a central composite rotatable design, it was studied the effect of ionic strength (between 0.15 and 0.75) and pH (between 3.47 and 10.54) on the apparent viscosity. The value of the viscosity of the first Newtonian plateau reached higher values in the pH range between 3 and 8, and ionic strength between 0.1 and 0.5 M.

For characterizing the ability of the biopolymer in stabilizing emulsions, EPS solutions with several biopolymer concentrations (0.25%, 0.5%, 1.0%, 1.5%) were used, along with different oil (sunflower oil)/water ratios: 20/80, 40/60, 60/40 and 80/20. The emulsifying index after 24h of maturation (E_{24}) was higher for EPS concentrations of 1% and 1.5%, reaching indexes of 100% (except the emulsions from 80/20 O:W).

From the stability assessment by centrifugation it was found that the emulsions produced with biopolymer at a concentration of 1.5% and an O:W ratio of 60/40, were quite stable during 15 at 3805 xg, as no phase separation was observed.

Keywords: Extracellular polysaccharide, Glycerol, *Enterobacter* A47, Rheology, Emulsions.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
EXTENDED ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. POLISSACÁRIDOS.....	14
2.2. FUCOPOL – EXOPOLISSACARIDO CONTENDO FUCOSE.....	15
2.3. EMULSÕES.....	16
2.3.1. Classificação das emulsões.....	16
2.3.2. Formação de emulsões	16
2.3.3. Mecanismos de instabilidade das emulsões	18
2.4. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS MATERIAIS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. MEDIÇÃO DA VISCOSIDADE E DAS PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS	23
3.2. ESTUDO DA CAPACIDADE ESPESSANTE DO BIOPOLÍMERO.....	23
3.2.1. Efeito do tempo de agitação na viscosidade aparente	23
3.2.2. Estudo do efeito pH e da força iônica da viscosidade aparente	24
3.3. ESTUDO DA CAPACIDADE DE SOLUÇÕES DE BIOPOLÍMERO NA ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEO EM ÁGUA	25
3.3.1. Preparação das emulsões.....	25
3.3.2. Avaliação da capacidade emulsionante e estabilidade.....	26
3.3.3. Estudo das propriedades reológicas	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. CAPACIDADE ESPESSANTE	27

4.1.1.	Efeito do tempo de agitação na viscosidade aparente de soluções de biopolímero	27
4.1.2.	Estudo do efeito pH e da força iônica da viscosidade aparente	29
4.2.	CAPACIDADE DE ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÃO	34
4.2.1.	Viscosidade aparente e propriedades viscoelásticas das soluções de EPS usadas na formação das emulsões.....	34
4.2.2.	Propriedades das emulsões	37
4.2.2.1.	Índice de emulsificação (E24h).....	37
4.2.2.2.	Viscosidade aparente das emulsões	39
4.2.2.3.	Propriedades viscoelásticas das emulsões.....	42
4.2.2.4.	Avaliação da estabilidade das emulsões sob centrifugação	46
5.	CONCLUSÕES.....	48
6.	SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO	50
	BIBLIOGRAFIA.....	I

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Experiências do desenho experimental rotacional composto	25
Tabela 4.1 Variáveis dependentes e parâmetros do modelo de Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) para as experiências do estudo do efeito da força iônica e pH no biopolímero a 1,0% .	29
Tabela 4.2 Análise da variância de equação de segunda ordem para o parâmetro η_0 (ajuste ao modelo de Cross)	30
Tabela 4.3 Análise da variância de equação de segunda ordem para o parâmetro τ (ajuste ao modelo de Cross)	31
Tabela 4.4 Variáveis de resposta (viscosidade e tempo de relaxação) ajustadas às equações do modelo das superfícies de resposta e modelo de Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) .	33
Tabela 4.5 Parâmetros do modelo da Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) para as soluções de EPS a 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5% utilizados na formulações das emulsões.	35
Tabela 4.6 Índice de emulsificação (E_{24}).....	38
Tabela 4.7 Viscosidade aparente à taxa de deformação de $1s^{-1}$ das suspensões e emulsões formas e das soluções de EPS usadas.	40
Tabela 4.8 Valores dos parâmetros do modelo de Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) para as emulsões formadas.....	41
Tabela 4.9 Valores de β da regressão não-linear power law, para as diferentes emulsões estudadas	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Curvas de tensão vs taxa de deformação de fluidos não newtonianos (Fonte: Castro et al., 2001)	20
Figura 2.2 Curva de viscosidade típica de uma emulsão e respectivas mudanças estruturais características do fluido reofluidificante (Fonte: Raymundo, 1999)	20
Figura 4.1 Curvas de escoamento para soluções de biopolímero em 0,4 M NaCl em função do tempo (♦12h, ■24h, ▲36h, ●48h, ★72h): (a) biopolímero a 1,0% e 1,5% sem ajuste de pH e (b) biopolímero a 1,5% a pH=7.....	27
Figura 4.2 Superfície de resposta da Viscosidade aparente do primeiro patamar Newtoniano (η_0) para as soluções de biopolímero obtidas a diferentes valores de pH e força iônica	30
Figura 4.3 Superfície de resposta do tempo de relaxação (τ) para as soluções de biopolímero obtidas a diferentes forças iônicas e pH.	32
Figura 4.4 Curva de viscosidade das soluções de EPS (♦0,25%, ■0,5%, ▲1,0% e ●1,5%) usadas para preparação das emulsões. As linhas contínuas ilustram o ajuste dos dados ao modelo de Cross.....	34
Figura 4.5 Variação do módulo de conservação G' (símbolos a cheio) e do módulo de dissipação G'' (símbolos a vazio) nas curvas de varrimento de tensão e frequência para soluções de EPS a 1% (▲e △) e 1,5% (●e ○) usados na preparação das emulsões.....	36
Figura 4.6 Aspecto das emulsões preparadas com cada formulação estudada	37
Figura 4.7 Curva de viscosidade das emulsões formadas (♦20/80, ■40/60, ▲60/40, ●80/20) para cada concentração de EPS. As linhas ilustram o ajuste dos dados ao modelo de Cross.	39

Figura 4.8 Variações do módulo de conservação G' (símbolos a cheio) e do módulo de dissipação G'' (símbolos a vazio) nas curvas de varrimento de tensão das suspensões e emulsões (◆ e ◇ 20/80, ■ e □ 40/60, ▲ e △ 60/40, ● e ○ 80/20) obtidas a partir de diferentes concentrações de EPS. 42

Figura 4.9 Variações do módulo de conservação G' (símbolos a cheio) e do módulo de dissipação G'' (símbolos a vazio) nas curvas de varrimento de frequência das suspensões e emulsões (◆ e ◇ 20/80, ■ e □ 40/60, ▲ e △ 60/40, ● e ○ 80/20) obtidas a partir de diferentes concentrações de EPS 43

Figura 4.10 Aspecto das emulsões após centrifugação 46

1. INTRODUÇÃO

Os polissacáridos são macromoléculas de elevado peso molecular, de estrutura linear ou ramificada, cujos monómeros são açúcares (por exemplo glucose, galactose, manose, fucose), ligados entre si por ligações glicosídicas. Os polissacáridos mais utilizados a nível industrial têm origem em recursos naturais, designadamente plantas, algas, animais e microorganismos.

Os polissacáridos microbianos são uma alternativa válida para substituição dos obtidos das restantes fontes mencionadas, na medida em é possível ter uma produção constante ao longo de todo o ano com a obtenção de um produto com características constantes independentes das condições climáticas. A produção microbiana permite também a manipulação das condições de operação de modo a obter produtos com características diferenciadas (Santos, 2011)

Para um polissacárido microbiano poder ser competitivo, este deve possuir propriedades semelhantes ou melhores em comparação com os já usados a nível industrial, designadamente no que diz respeito às propriedades reológicas das suas soluções aquosas. É vantajoso que estas sejam estáveis durante mudanças de temperatura, pH e força iónica. Além disso, deve ter composição química compatível com o metabolismo humano e aprovação prévia dos órgãos competentes, para ser utilizado em produtos para consumo humano, como alimentos, fármacos e cosméticos. Devido, às propriedades funcionais versáteis, os biopolímeros podem se tornar produtos de grande interesse na criação de novas texturas, como espessantes ou como estabilizantes.

Estudos estão a ser desenvolvidos para otimizar o processo de produção visando à obtenção de polissacáridos com potencial aplicação industrial e alta produtividade. No entanto, para a produção industrial, é de extrema importância o desenvolvimento de processos com custos mais reduzidos e menor impacto no preço do produto.

O Glicerol, o principal sub-produto da indústria de Biodiesel, tem sido gerado em elevadas quantidades gerando excedentes no mercado. Freitas et al. (2011) reportou recentemente a produção de um biopolímero de origem bacteriana *Enterobacter* estirpe A47 usando glicerol como fonte de carbono. O biopolímero produzido é um heteropolissacarido extracelular de

elevado peso molecular. O glicerol apresenta-se assim uma boa fonte de carbono a baixo custo.

Procura-se com este trabalho, avaliar as características reológicas do biopolímero microbiano – FucoPol – produzido em caldo fermentativo rico em glicerol, bem como a sua capacidade estabilizante de emulsões.

O presente trabalho está organizado em cinco capítulos. Para além deste capítulo introdutório no capítulo 2 faz-se uma revisão bibliográfica dos principais aspectos teóricos relacionados com polissacáridos, formação de emulsões e principais métodos usados em estudos reológicos. No capítulo 3, descrevem-se os materiais e métodos usados ao longo de todo o trabalho. No capítulo 4, são apresentados e discutidos os resultados obtidos, no que diz respeito ao efeito da força iónica e do pH na viscosidade de soluções aquosas de Fucopol, bem como à sua capacidade de estabilização de emulsões de óleo de girassol/água. No capítulo 5 resumem-se as principais conclusões do trabalho e levantam-se sugestões para trabalho futuro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLISSACÁRIDOS

Os polissacáridos têm uma vasta gama de aplicações, incluindo indústria alimentar, farmacêutica, cosméticos, entre outras, devido à diversidade das suas propriedades físicas e químicas. São usados como agentes espessantes, gelificantes, estabilizantes, emulsionantes e floculantes. As fontes de polissacáridos naturais incluem plantas (p.e. amido e pectina), algas (p.e. alginato e agar), animais (p.e. quitosano) e microorganismos (p.e. xantana e gelana) (Kumar et al., 2007). Contudo, a produção de polissacáridos por via microbiana apresenta vantagens em comparação com as outras fontes, uma vez que os microorganismos apresentam maiores taxas de crescimento e maior facilidade na manipulação das condições de produção, e que ao contrário de outras fontes, os microorganismos não são influenciados pelas alterações ambientais ou sazonais (Santos, 2011)

Os polissacáridos microbianos podem apresentar-se como constituintes da parede celular (lipopolissacáridos ou LPS), associados covalentemente à superfície celular (polissacáridos capsulares ou CPS), ou excretados para o meio extracelular (exopolissacáridos ou EPS). A aplicação industrial, de modo geral, está concentrada nos EPS, pois apresentam um processo de extracção e purificação mais simples, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada (Boels et al., 2001)

O principal factor limitante na comercialização de polissacáridos de origem microbiana prende-se com o elevado custo da fonte de carbono (p.e. glucose ou sacarose) (Kumar et al., 2007). Actualmente a goma xantana é o único polissacárido microbiano com peso no mercado. Existe um esforço para a redução de custo de produção passam pelo uso de fontes de carbono mais baratos (como subprodutos de indústrias) ou optimização das condições de fermentação de modo a aumentar o rendimento em produto.

2.2. FUCOPOL – EXOPOLISSACARIDO CONTENDO FUCOSE

Os polissacáridos contendo fucose, em adição às suas propriedades de reguladores de viscosidade, estabilização de emulsões e/ou formação de filmes, têm um valor acrescentado no mercado uma vez que a fucose é um dos açúcares raros, de difícil obtenção, com diversas aplicações onde se incluem os cosméticos e produtos farmacêuticos (Vanhooren & Vandamme, 1999). Preparados contendo fucose, e oligo- e polissacaridos contendo fucose são reportados como tendo propriedades biológicas com potencial uso terapêutico, como por exemplo agentes anti-cancerígenos e anti-inflamatórios (Cescutti et al., 2005)

O presente trabalho centra-se no estudo das propriedades reológicas em solução aquosa, designadamente, as capacidades espessante e de estabilização de emulsões de óleo/água de um novo exopolissacárido (EPS) bacteriano contendo fucose – o Fucopol. Este é produzido por uma estirpe bacteriana recentemente isolada cultivada em meio com glicerol (subproduto da indústria do biodiesel). Esta estirpe foi identificada e denominada *Enterobacter* A47. A produção do exopolissacárido pela *Enterobacter* A47 foi realizada em condições controladas de temperatura e pH (30,0 °C e 6,80) apresentando um elevado peso molecular ($\sim 5,0 \times 10^6$). Tipicamente, o Fucopol é composto por açúcares, nomeadamente, fucose (32 – 36 %mol), galactose (25 – 26 %mol), glucose (28 – 34 %mol) e ácido glucorónico (9 – 10 %mol), e grupos acilo, particularmente acetato (3 – 5 %m/m), piruvato (13 – 14 %m/m) e succinato (3 %m/m) e por uma fracção de proteína (cerca de 5 % m/m) no seu peso (Torres, 2012).

O glicerol, sendo um subproduto de diversos processos industriais, principalmente da produção de biodiesel, é gerado em grande quantidade. O uso do glicerol como fonte de carbono pode contribuir para a redução dos custos de produção.

Freitas et al., 2011, num estudo da viscosidade de soluções aquosas deste novo polissacárido contendo fucose, verificaram um comportamento reológico reofluidificante. Nesse mesmo estudo, foram efectuados ensaios preliminares de modo a avaliar o seu potencial de agente estabilizante de emulsões (com soluções aquosas de polímero a 0,5% m/m) onde se verificou a capacidade deste polímero para estabilização de emulsões com óleos vegetais, o que sugere a sua potencial aplicação na indústria alimentar.

Cruz et al., 2011, estudou a influência da temperatura no comportamento reológico de soluções aquosas deste polissacárido verificando que este manteve as suas propriedades

reológicas a 25°C sob consecutivas flutuações de temperatura, mesmo após aquecimento acima de 80°C. Este novo polissacárido produz soluções aquosas que são termoreologicamente estáveis, sugerindo que pode ser aplicado em processos com variações de temperatura (p.e. processamento de alimentos).

2.3. EMULSÕES

Emulsão é uma dispersão coloidal formada por dois líquidos imiscíveis (geralmente óleo e água) com um dos líquidos dispersos no outro sob a forma de gotas. A substância que está contida nas gotas designa-se por fase dispersa ou interna e a substância que constitui o meio envolvente designa-se por fase contínua ou exterior (Raymundo, 1999).

2.3.1. Classificação das emulsões

De acordo com a distribuição das duas fases (óleo e água), as emulsões podem ser classificadas em O/A (óleo em água) quando as gotas de óleo estão dispersas na fase aquosa (Figura 2.1). Se as gotas de água estão dispersas na fase contínua de óleo, então é uma emulsão do tipo A/O (água em óleo). Pode também existir emulsões múltiplas O/A/O ou A/O/A

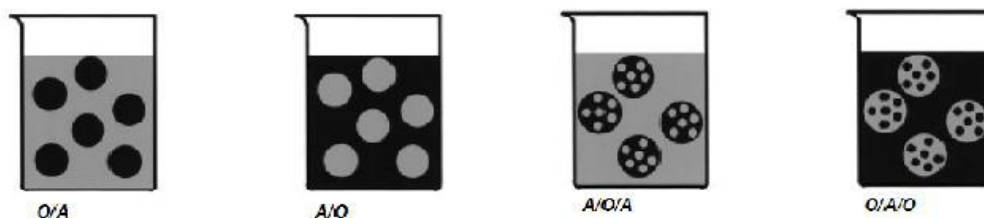


Figura 2.1 Tipos de emulsões presentes num sistema composto por água e óleo (Fonte: Melo, 2007)

2.3.2. Formação de emulsões

É possível formar uma emulsão homogeneizando água e óleo puros, mas as duas fases separam-se rapidamente, formando um sistema com uma camada de óleo (menos densa) sobre uma camada aquosa (mais densa). Para além da diferença de densidades, a força motriz para este processo de separação consiste no facto de o contacto entre gotas de óleo e água serem energeticamente desfavoráveis, ou seja, as emulsões são termodinamicamente

instáveis. Contudo, apesar da natureza instável das emulsões, é possível recorrer à utilização de emulsionantes e/ou agentes espessantes para se obter uma emulsão cineticamente estável (Raymundo, 1999).

As proteínas são os agentes emulsionantes mais comuns no processamento de alimentos. Os agentes emulsionantes não só promovem a formação de emulsões como melhoram a sua estabilidade uma vez que reduzem a tensão interfacial óleo-água e formam uma membrana protectora em torno das gotas de fase dispersa, que impede que estas se aproximem demasiado umas das outras, evitando a sua agregação e posterior coalescência (Calero et al., 2013).

Os agentes espessantes são geralmente utilizados para aumentar a viscosidade da fase contínua, melhorando a estabilidade das emulsões por dificultarem os movimentos das gotas. Os agentes espessantes mais utilizados nos alimentos são polissacáridos, como por exemplo o amido e a goma xantana. De um modo geral, os polissacáridos não apresentam capacidade de adsorção na interface óleo/água uma vez que não têm propriedades anfifílicas.

Há um interesse crescente em explorar as potencialidades de proteínas e polissacáridos, para a obtenção de emulsões com boa estabilidade. Podem ocorrer interações entre proteínas e polissacáridos, e estes complexos apresentarem melhores propriedades funcionais do que quando usados individualmente, o que oferece oportunidades para a concepção de novos ingredientes, com aplicações na indústria alimentar (Calero et al., 2013).

A formação de uma emulsão está relacionada com o fornecimento de energia de modo a vencer a tensão interfacial e a aumentar a área interfacial entre os dois líquidos imiscíveis e consequentemente aumenta a energia do sistema (energia livre de Gibbs). O aumento de energia de emulsificação permite uma maior redução do tamanho das gotas da emulsão, mas apenas até ao ponto em que haja emulsionante suficiente para cobrir a interface.

O pH e a concentração de sal são dois factores com grande influência nas propriedades emulsionantes. No caso de produtos alimentares do tipo das maioneses ou molhos, os valores de pH são legalmente impostos e a concentração de sal é limitada pela avaliação sensorial dessas emulsões (normalmente cerca de 1% m/m) (Raymundo, 1999). É importante compreender como estes factores influenciam as propriedades das emulsões.

2.3.3. Mecanismos de instabilidade das emulsões

Entende-se por estabilidade da emulsão a capacidade que esta apresenta para resistir às alterações das suas propriedades ao longo do tempo. Considera-se que uma emulsão é estável quando o número, distribuição de tamanhos de gotas e a disposição espacial das gotas da fase dispersa não sofre uma alteração perceptível ao longo do tempo de armazenamento (Raymundo, 1999).

A instabilização da emulsão pode ocorrer devido a vários fenómenos, designadamente: (i) formação de cremado, quando as gotas da fase dispersa se movem para o topo da emulsão; (ii) sedimentação, quando as gotas da fase dispersa se deslocam para a base da emulsão e (iii) floculação, quando existe agregação entre as gotas de fase dispersa, mas mantendo um filme de fase contínua entre elas. As três situações anteriores podem ser seguidas pelo fenómeno de coalescência, que existe quando duas ou mais gotas se juntam para formar uma gota com maior volume, induzida por uma ruptura do filme líquido entre as gotas (Vianna-Filho et al., 2012). O fenómeno de coalescência pode ter lugar a partir do estado inicial da emulsão, sem a ocorrência prévia da sedimentação, formação de cremado ou floculação. Um fenómeno de coalescência acentuado pode levar à separação de fases.

O estudo das propriedades reológicas das emulsões fornece informações sobre a sua estabilidade física. Os factores que controlam a reologia das emulsões são (i) a reologia da fase contínua; (ii) a natureza das gotas, tais como o tamanho e sua distribuição, deformação, viscosidade interna e concentração; e (iii) a natureza das interações entre gotas (Barnes, 1994 citado por Vianna-Filho, et al., 2012).

As dispersões de polissacáridos em água resultam em diferentes comportamentos reológicos devido à sua estrutura e conformação molecular, sendo incorporados na fase contínua de emulsões óleo-em-água (O/A).

2.4. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS MATERIAIS

O estudo das propriedades reológicas dos polímeros em solução dá indicações sobre a sua conformação e as interações entre as macromoléculas em solução. Permite avaliar objectivamente o poder espessante e a sua capacidade gelificante que são propriedades importantes para o seu uso em produtos alimentares (Castro et al., 2001). Tal como nas soluções de polímeros, o conhecimento das propriedades reológicas das emulsões é

importante uma vez que os atributos sensoriais e o tempo de vida dos produtos estão muitas vezes relacionados com o seu comportamento reológico (Davis, 1973, citado por Raymundo, 1999)

A caracterização reológica dos materiais tem subjacente a definição teórica de três materiais ideais: o sólido elástico ideal, o líquido ideal e o material viscoelástico. (Mitchell, 1979 citado por Raymundo, 1999)

Viscosidade

No que diz respeito à viscosidade, muitos fluidos, denominados *fluidos newtonianos*, seguem a lei de Newton que determina que durante o escoamento a tensão tangencial é proporcional à velocidade de deformação:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde: τ – Tensão (Pa); η – Viscosidade (Pa.s) e $\dot{\gamma}$ – Taxa de deformação (s^{-1}) ($=d\gamma/dt$).

No entanto, na prática encontram-se fluidos com comportamentos mais complexos, cujo escoamento não é descrito pela lei de Newton, aos quais se dá o nome de *fluidos não newtonianos*. A manifestação destes comportamentos mais complexos, expressa-se por uma dependência da viscosidade em relação à taxa de deformação, $\eta = f(\dot{\gamma})$; ou por uma dependência da viscosidade em relação ao tempo $\eta = f(t)$.

Muitas soluções (especialmente se forem concentradas) e dispersões (especialmente se contiverem partículas assimétricas, por exemplo, na formas de disco ou bastão) apresentam comportamento não newtoniano. As principais causas do escoamento não newtoniano são a organização das moléculas e/ou partículas no sistema com o aumento da taxa de deformação aplicada.

Quando um material apresenta comportamento não newtoniano, a sua viscosidade tanto pode aumentar (reoespessante) como diminuir (reofluidificante) com o aumento da velocidade de deformação, designando-se a viscosidade obtida a cada taxa de deformação, por viscosidade aparente.

As curvas tensão vs velocidade de deformação de fluidos não newtonianos, encontram-se na figura 2.1

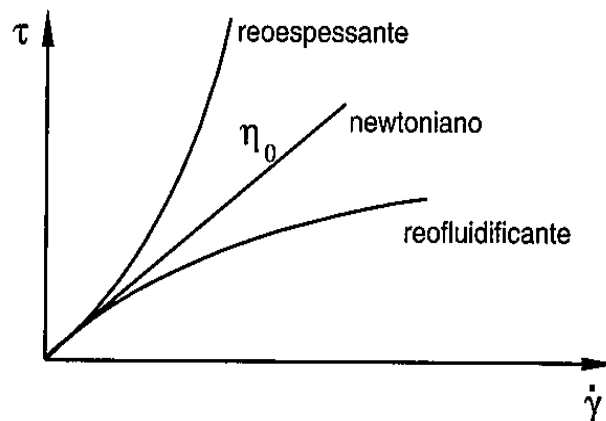


Figura 2.1 Curvas de tensão vs taxa de deformação de fluidos não newtonianos (Fonte: Castro et al., 2001)

A maior parte de soluções poliméricas apresentam um comportamento reofluidificante. Este comportamento é consequência da quebra de interações moleculares e do alinhamento das cadeias de polímero na direcção do escoamento com o aumento do gradiente de velocidade.

Na Figura 2.2 encontra-se representada uma curva de escoamento típica de uma emulsão.

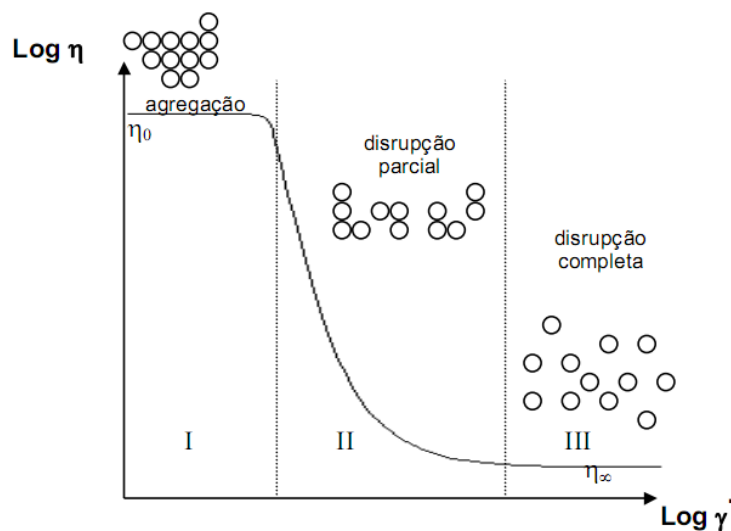


Figura 2.2 Curva de viscosidade típica de uma emulsão e respetivas mudanças estruturais características do fluido reofluidificante (Fonte: Raymundo, 1999)

A baixa velocidade de deformação (zona I), o fluido tem um comportamento newtoniano, caracterizado por uma viscosidade limite η_0 , que corresponde ao máximo valor que o sistema pode tomar naquelas condições de pressão e temperatura. Na zona intermédia (zona II)

verifica-se um comportamento reofluidificante, ocorrendo um decréscimo da viscosidade com a velocidade de deformação. Na zona III, as altas velocidades de deformação verifica-se novamente um comportamento newtoniano, caracterizado também por uma viscosidade limite η_{∞} (Raymundo, 1999).

A equação de Cross é usada para descrever o comportamento do fluido em função da variação da viscosidade com a taxa de deformação para fluidos com comportamento reofluidificante:

$$\eta_a - \eta_{\infty} = \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + \left(\tau \cdot \dot{\gamma} \right)^m} \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde: η_a – viscosidade aparente (Pa.s), η_0 – viscosidade limite correspondente ao primeiro patamar newtoniano (Pa.s), η_{∞} – viscosidade limite correspondente ao segundo patamar newtoniano (Pa.s), $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s^{-1}), τ – constante de tempo (s) e m – constante adimensional que pode ser relacionada com a lei da potencia (n) onde $m=1-n$ e n representa o índice de escoamento e mede o desvio do comportamento newtoniano ($n=1$).

Viscoelasticidade

As propriedades viscoelásticas são determinadas a partir da realização de testes dinâmicos. Nos testes dinâmicos aplica-se ao material uma tensão com uma variação sinusoidal e regista-se a deformação sinusoidal resultante, ou *vice versa*. Estas medições dinâmicas são não destrutivas, onde se aplicam tensões oscilatórias de pequena amplitude de modo a não provocarem a destruição da estrutura do material, ou seja deverá ser uma tensão contida na zona viscoelástica linear, onde a tensão é proporcional à deformação, sendo as propriedades reológicas independentes da tensão aplicada.

Para materiais viscoelásticos é comum expressar as suas propriedades em termos dos seus módulos de conservação (G') e módulo de dissipação (G''). O equipamento aplica uma tensão tangencial (ou uma deformação distorcional), sinusoidal, com uma determinada amplitude e frequência, e regista como resposta a deformação provocada (ou a tensão desenvolvida), respectivamente, conforme se trata de um reómetro de tensão ou de deformação controlada (Castro et al., 2001).

A determinação das propriedades viscoelásticas de qualquer material é normalmente efectuado em duas etapas distintas:

- i. Varrimento Tensão: para determinação do intervalo viscoelástico linear. Determina a estabilidade mecânica da amostra através de ensaio de varrimento de tensão (no caso de um reómetro de tensão controlada), onde é aplicada a tensão sobre amostra, mantendo a frequência de oscilação e temperatura constantes, registando-se os valores de G' e G'' obtidos, em função da tensão aplicada. Pretende-se com este teste determinar a máxima tensão que é possível aplicar ao material sem que ocorra ruptura da sua estrutura interna.
- ii. Varrimento de Frequência: Esse ensaio, subsequente a varrimento de amplitude de tensão, é utilizado para caracterizar a conformação e as interações intermoleculares dos materiais em diferentes estados de coesão, registando-se os valores de G' e G'' obtidos, em função da frequência aplicada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O biopolímero estudado foi produzido em biorreactor usando a bactéria *Enterobacter* A47 e glicerol proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono. Após a produção, o biopolímero foi separado do caldo de fermentação e purificado, estando pronto para estudo das suas propriedades reológicas e da sua aplicação em emulsões.

3.1. MEDIÇÃO DA VISCOSIDADE E DAS PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS

A medição da viscosidade aparente das soluções aquosas de biopolímero e das emulsões foi efectuada usando um reómetro de tensão controlada (Haake RS-75, Alemanha) equipado com geometria cone-prato, com um cone de 35 mm de diâmetro e um ângulo de 2 graus. Durante os ensaios com soluções aquosas de biopolímero, a interface entre a amostra e o ar foi coberta com parafina líquida de modo a minimizar a sua desidratação.

As curvas de escoamento foram determinadas para uma gama de taxa de deformação de 1 a 700 s⁻¹. A taxa de deformação foi aplicada de forma crescente em degraus consecutivos com uma duração de 60 segundos, durante os quais se atingiu o estado estacionário e se mediu a viscosidade da solução.

A medição das propriedades viscoelásticas iniciou-se com um varrimento de tensão a frequência constante ($f=1\text{Hz}$), de modo a identificar a zona de viscoelasticidade linear. De seguida efectuaram-se os varrimentos de frequência, com um valor de tensão fixo ($\tau = 1 \text{ Pa}$, comum em todas as amostras de biopolímero e de emulsões) seleccionado na zona de viscoelasticidade linear, de modo a obter os espectros mecânicos.

3.2. ESTUDO DA CAPACIDADE ESPESSANTE DO BIOPOLÍMERO

3.2.1. Efeito do tempo de agitação na viscosidade aparente

As soluções aquosas de biopolímero (1,0% m/m e 1,5% m/m) foram preparadas por dissolução em solução aquosa com uma força iónica constante (NaCl 0,4 M). Às soluções adicionou-se azida de sódio a uma concentração de 10 ppm para prevenir o crescimento de

microorganismos. Após 12h sob agitação, retirou-se uma amostra para a avaliação da viscosidade aparente. As soluções foram mantidas sob agitação, e repetiu-se o procedimento em intervalos regulares de cerca de 12 horas (até um máximo de 72h), de modo a avaliar a evolução da sua viscosidade aparente ao longo do tempo.

Procedeu-se ainda à reprodução do mesmo ensaio, no qual se ajustou o pH das soluções a pH = 7, adicionando pequenas gotas de soluções de NaOH (20% m/m) e/ou HCl (15% m/m), antes da medição da viscosidade aparente.

3.2.2. Estudo do efeito pH e da força iónica da viscosidade aparente

As soluções de biopolímero estudadas nesta secção foram preparadas por dissolução em soluções de NaCl com a força iónica pretendida, sob agitação, em durante 24h. O tempo de agitação foi escolhido tendo em conta os resultados apresentados na secção 4.1.1, em que se verificou que nas primeiras 24h não há alteração significativa das curvas de escoamento. Após esse tempo, ajustou-se o pH das soluções ao pH pretendido (Tabela 3.1), adicionando pequenas gotas de soluções de NaOH (20% m/m) e/ou HCl (15% m/m), medindo-se de seguida as propriedades reológicas.

O estudo do efeito da força iónica e do pH na viscosidade aparente foi realizado usando um desenho experimental rotational de superfície de resposta composto com base em duas variáveis independentes, a força iónica (FI) e o pH, mantendo-se constante a concentração do polímero (1% m/m) e a temperatura ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nestas soluções não foi usada azida de sódio, uma vez que em 24h não se prevê desenvolvimento microbiano.

Metodologia das superfícies de resposta

A metodologia das superfícies de resposta (RSM) é um método de planeamento experimental que permite obter um modelo matemático que correlaciona as variáveis dependentes (Y) com as variáveis independentes (xi) de um determinado processo. A função polinomial seguinte descreve o modelo quadrático com duas variáveis:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \text{residual}$$

A função polinomial acima descrita contém parâmetros desconhecidos ($b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}, b_{12}$) que serão determinados (Lundstedt et al., 1998)

A tabela 3.1 representa as condições de biopolímero à FI e pH, para cada ensaio.

Tabela 3.1 Experiências do desenho experimental rotacional composto

FI (M)	pH	
0,15	4,5	Desenho factorial
0,65	4,5	
0,15	9,5	
0,65	9,5	
0,40	7,0	Ponto central
0,40	7,0	
0,40	7,0	
0,05	7,0	Pontos axiais
0,75	7,0	
0,40	3,47	
0,40	10,54	
0,10	4,0	Validação
0,30	6,0	
0,50	8,0	
0,60	10,0	

As superfícies de resposta foram obtidas usando o software de estatística Statistic 7.

3.3. ESTUDO DA CAPACIDADE DE SOLUÇÕES DE BIOPOLÍMERO NA ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE ÓLEO EM ÁGUA

3.3.1. Preparação das emulsões

O estudo teve por base a variação da concentração de polímero na fase aquosa e a proporção óleo/água na formulação das emulsões. As emulsões foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento:

1. Dissolução do biopolímero em água destilada durante 24h sob agitação à temperatura ambiente; para a preparação de soluções com as seguintes concentrações: 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5% (m/m).
2. Adição do óleo (óleo de girassol comercial) a cada solução de polímero, nas seguintes proporções O/A (m/m): 20/80, 40/60, 60/40 80/20.
3. Agitação mecânica com Homogeneizador Ultraturrax a 13500 rpm durante 5 min.

4. Maturação das emulsões previamente preparadas, durante um período de 24h à temperatura de refrigeração de 4°C.

3.3.2. Avaliação da capacidade emulsionante e estabilidade

Após o período de maturação, foi avaliada o índice de emulsificação após 24h (E_{24}), usando a Equação 3.1:

$$E_{24} = \frac{h_e}{h_T} \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

onde: h_e (mm) é altura da camada de emulsão e h_T (mm) a altura total.

Procedeu-se ainda ao estudo de estabilidade sob centrifugação durante 15 min a 3805xg (centrífuga HERMLE Z383K).

3.3.3. Estudo das propriedades reológicas

Foram estudadas as propriedades reológicas de todas as emulsões produzidas, independentemente do índice de emulsificação E_{24} . Este estudo consistiu na medição da viscosidade aparente, bem como das propriedades viscoelásticas com base em varrimentos de tensão e de frequência, de acordo com o descrito no ponto 3.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CAPACIDADE ESPESSANTE

4.1.1. Efeito do tempo de agitação na viscosidade aparente de soluções de biopolímero

Na Figura 4.1 são apresentadas as curvas de escoamento das soluções de biopolímero para vários tempos de agitação, designadamente, para concentrações de biopolímero de 1% e 1,5% m/m sem ajuste de pH (Fig. 4.1 a), e para a concentração de 1,5% m/m com ajuste de pH para pH=7 (Fig. 4.1 b).

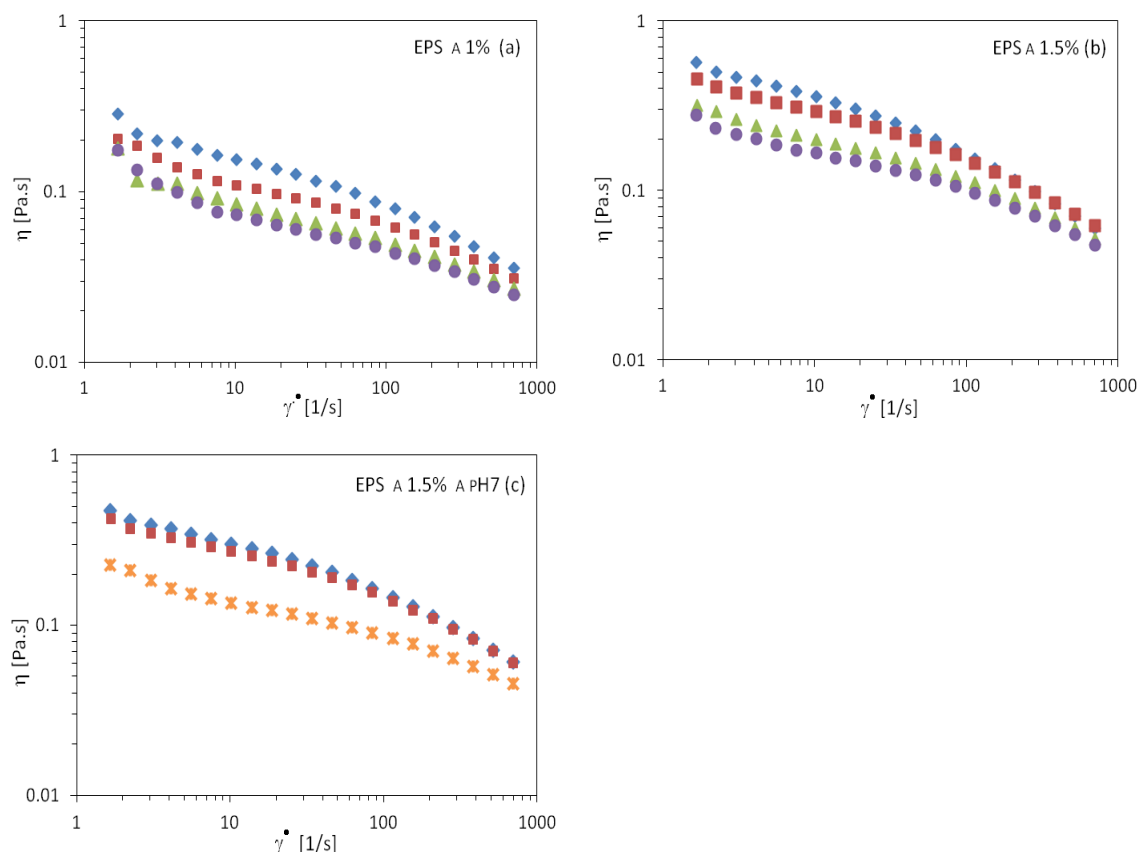


Figura 4.1 Curvas de escoamento para soluções de biopolímero em 0,4 M NaCl em função do tempo (♦ 12h, ■ 24h, ▲ 36h, ● 48h, ★ 72h): (a) biopolímero a 1,0% e 1,5% sem ajuste de pH e (b) biopolímero a 1,5% a pH=7.

Verifica-se que quanto maior a concentração do polímero, maior a sua viscosidade aparente, independentemente do tempo de agitação a que a solução foi sujeita. Este facto deve-se ao

aumento do número e intensidade das interações entre as cadeias poliméricas com o aumento da quantidade de moléculas em solução.

As soluções apresentam um comportamento reofluidificante. Este comportamento é devido à quebra das interações entre moléculas, pois as forças aplicadas são mais fortes que essas interações, tendo como consequência o alinhamento das moléculas em solução. Este efeito reofluidificante é normalmente para polissacáridos em solução, como o caso do polissacárido goma xantana, sendo esta característica muito desejada em diversas situações, uma vez que do ponto de vista sensorial provocam menor sensação de gomosidade do que os biopolímeros com comportamento newtoniano (Díaz et al., 2004).

Freitas et al. (2009a) apresentam o mesmo comportamento reofluidificante em biopolímeros produzidos pela estirpe bacteriana *Pseudomonas oleovorans* com substrato de glicerol, tal como o biopolímero estudado neste trabalho, em solução de força iónica 0,1M para uma concentração de 0,01 g/mL. Contudo, o biopolímero obtido por este autor apresenta um comportamento newtoniano a uma baixa taxa de deformação o que não se verificou nas curvas de escoamento apresentadas na Figura 4.1.

Observa-se ainda que, ao longo do tempo de agitação, a viscosidade das soluções diminui, qualquer que seja a concentração de polímero. Verifica-se também que, para a concentração de 1,5% m/m, o facto de se ajustar o pH não impediu um decréscimo da viscosidade ao fim de 72h. Esta diminuição da viscosidade não será resultado da degradação do polímero devido a actividade microbiana, dado que se usou azida de sódio, nem devido a hidrólise ácida ou básica. Pensa-se que possa existir uma actividade enzimática promovida por enzimas provenientes do caldo de fermentação, que não tenham sido removidas durante o processo de purificação do polímero. Porém, a diminuição da viscosidade não é muito significativa entre as 12h e as 24h, tendo-se seleccionado um tempo de agitação de 24h para a preparação das soluções de polímero a utilizar na produção das emulsões, apresentadas na secção 4.2.

As curvas apresentadas apresentam uma forma, a baixas taxas de deformação, normalmente observada em ensaios em que a amostra tende a sair da geometria. No presente trabalho, essa forma pode ser atribuída à saída da parafina da zona de contacto com a amostra, alterando as forças interfaciais amostra/parafina. Este efeito deixou de se verificar nos ensaios das secções seguintes, uma vez controlada e mantida constante a quantidade de parafina em contacto com a amostra ao longo do ensaio.

4.1.2. Estudo do efeito pH e da força iónica da viscosidade aparente

Os processos industriais frequentemente envolvem condições extremas de pH, força iónica e temperatura. Por este motivo, é importante avaliar qual a evolução das características reológicas do EPS quando se faz variar estas condições. Neste trabalho, apenas se avalia a influência da variação do pH e da força iónica sobre as características reológicas, usando a metodologia RSM.

O desenho experimental foi efectuado mantendo constante a concentração de biopolímero a 1% m/m, fazendo variar a força iónica (FI) e o pH. O biopolímero usado foi proveniente de um batch de produção diferente do usado para estudo da capacidade espessante.

Foi ajustado o modelo de Cross às curvas de escoamento medidas para cada solução de polímero do desenho experimental, e os parâmetros obtidos são apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Variáveis dependentes e parâmetros do modelo de Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) para as experiências do estudo do efeito da força iónica e pH no biopolímero a 1,0%

FI	pH	η_0 (Pa.s)	τ (s)	$m^{(*)}$	R^2
0,15	4,5	0,938±0,045	0,109±0,018	0,710±0,034	0,984
0,65	4,5	0,949±0,047	0,134±0,022	0,699±0,032	0,987
0,15	9,5	0,615±0,035	0,079±0,015	0,682±0,038	0,986
0,65	9,5	0,619±0,008	0,056±0,002	0,734±0,010	0,984
0,4	7	1,119±0,091	0,228±0,074	0,608±0,054	0,974
0,4	7	1,278±0,029	0,134±0,009	0,727±0,013	0,990
0,4	7	1,222±0,017	0,118±0,005	0,740±0,010	0,984
0,05	7	0,523±0,006	0,050±0,002	0,733±0,011	0,975
0,75	7	0,535±0,065	0,123±0,056	0,606±0,064	0,990
0,4	3,47	1,047±0,034	0,111±0,012	0,731±0,024	0,983
0,4	10,54	0,150±0,009	0,017±0,004	0,652±0,070	0,954
0,1	4	0,241±0,011	0,033±0,005	0,686±0,036	0,985
0,3	6	1,314±0,106	0,202±0,052	0,680±0,041	0,992
0,5	8	0,395±0,048	0,080±0,038	0,616±0,079	0,986
0,6	10	0,198±0,011	0,026±0,005	0,671±0,046	0,982

(*) Parâmetro adimensional

Usando o software statistic 7, efectuou-se o ajuste de um modelo quadrático à variação das variáveis dependentes viscosidade η_0 e tempo de relaxação τ , em função das variáveis independentes pH e força iónica. Não se fez o mesmo à variável dependente 'm' uma vez que o seu valor é praticamente constante para qualquer experiência efectuada.

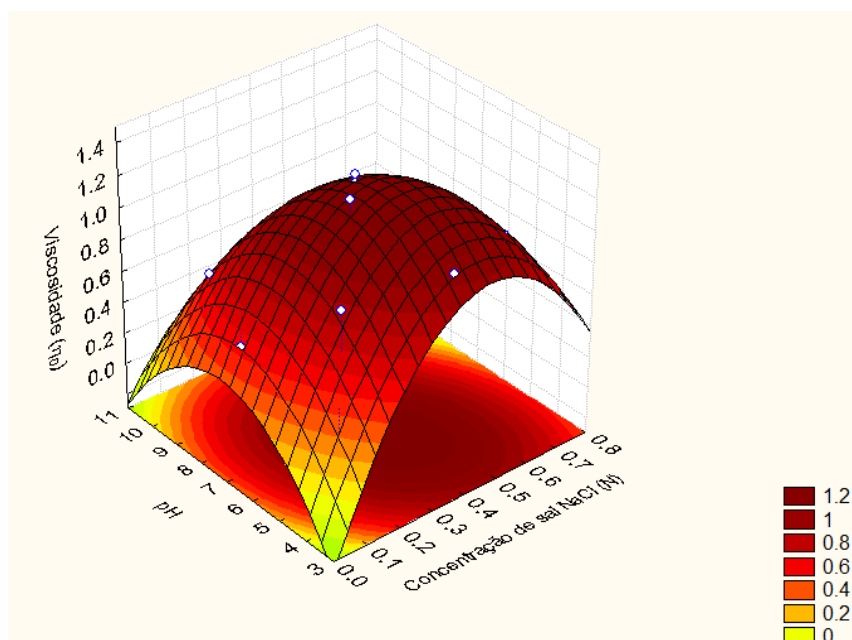
A tabela 4.2 apresenta a estatística ANOVA, onde se apresenta os coeficientes lineares (L), quadráticos (Q) e interação (L by L) da força iônica NaCl e pH na variável dependente η_0 .

Tabela 4.2 Análise da variância de equação de segunda ordem para o parâmetro η_0 (ajuste ao modelo de Cross)

	SS	Df	MS	F - values	p - value
FI (L)	0,0007	1	0,0007	0,0357	0,8563
FI (Q)	0,8347	1	0,8347	44,1453	0,0006
pH (L)	0,1958	1	0,1958	10,3539	0,0182
pH (Q)	0,3454	1	0,3454	18,2675	0,0052
FI(L) by pH(L)	0,1305	1	0,1305	6,9007	0,0392
Erro	0,1134	6	0,0189		
Total SS	1,7184	11			
r ajustado	0,8789				
R ²	0,94				

A análise estatística mostra um ajuste satisfatório ($R^2=0,94$, $R_{ajus} = 0,87$). Verifica-se que FI (L) é o único parâmetro não afecta significativamente o valor de η_0 ($p > 0,05$).

A superfície de resposta em 3D (figura 4.2) evidencia a resposta da variável dependente η_0 , às variações das variáveis independentes (FI e pH).



$$\eta_0 = -1,8 - 5,9 \times FI^2 + 0,6 \times pH - 0,04 \times pH^2 - 0,3 \times FI \times pH$$

Figura 4.2 Superfície de resposta da Viscosidade aparente do primeiro patamar Newtoniano (η_0) para as soluções de biopolímero obtidas a diferentes valores de pH e força iônica

Pela análise da figura, verifica-se que para condições pH e de força iônica próximos do ponto central (pH 7 e força iônica 0,4M) verifica-se um máximo para a viscosidade aparente. Variando o pH mantendo a FI constante a 0,4M concluiu-se que a um pH ácido 3,47 a viscosidade do EPS não sofre uma redução tão elevada quando comparado com um valor de pH alcalino de 10,47, uma vez que para um meio ácido essa redução é de aproximadamente 13% e em meio alcalino é de 88% do valor de viscosidade aparente central.

Quando se avalia a influência da força iônica, mantendo uma solução de pH=7, verifica-se que a viscosidade tem uma redução semelhante e de aproximadamente 57% para as FI de 0,05 e 0,75. Em todos os casos manteve-se o comportamento reofluidificante.

Freitas et al. (2009)^b retira do seu estudo conclusões semelhantes para o EPS produzido pela bactéria *Pseudomonas oleovorans* (apesar das suas condições serem diferentes uma vez que trabalha sem força iônica de 0,4M) quando faz variar o pH de uma solução de 1,2%, e conclui que a viscosidade do EPS não é significativamente alterada para pH ácido, mas que para soluções alcalinas a redução é significativa. Por outro lado, os resultados do mesmo estudo demonstram que a viscosidade aparente do EPS não foi alterada pelo aumento da força iônica até 1,0M de NaCl, sendo esta uma conclusão diferente do obtido no presente trabalho.

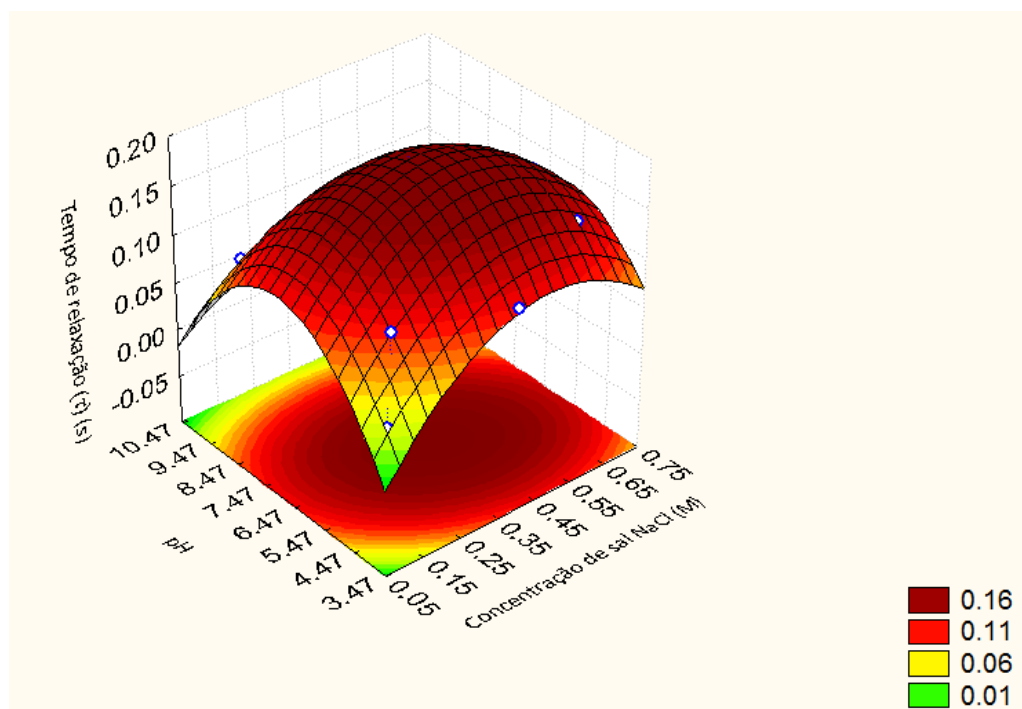
A tabela 4.3 apresenta a estatística ANOVA, onde se apresenta os coeficientes lineares (L), quadráticos (Q) e interação (L by L) da força iônica NaCl e pH na variável dependente, τ .

Tabela 4.3 Análise da variância de equação de segunda ordem para o parametro τ (ajuste ao modelo de Cross)

	SS	Df	MS	F - values	p - value
FI (L)	0,0001	1	0,0001	0,0496	0,8325
FI (Q)	0,0061	1	0,0061	5,4249	0,0672
pH (L)	0,0018	1	0,0018	1,6732	0,2523
pH (Q)	0,0164	1	0,0164	14,6023	0,0123
FI(L) by pH(L)	0,0018	1	0,0018	1,6039	0,2611
Erro	0,0056	5	0,0011		
Total SS	0,0405	10			
r ajustado	0,7224				
R ²	0,8612				

A análise estatística mostra um ajuste satisfatório ($R^2=0,86$). Verifica-se que o coeficiente linear da variável pH é a única que apresenta um p-value inferior a 0,05 indicando por isso ser significativa para a variabilidade do tempo de relaxação do biopolímero.

A superfície de resposta em 3D (figura 4.3) evidencia a resposta da variável dependente da constante de tempo, τ , às variações das variáveis independentes (FI e pH).



$$\tau = -0,4082 - 0,01 \times \text{pH}^2$$

Figura 4.3 Superfície de resposta do tempo de relaxação (τ) para as soluções de biopolímero obtidas a diferentes forças iônicas e pH.

Tal como para a viscosidade η_0 , o tempo de relaxação (τ) não varia significativamente com a variação da força iônica e pH para valores próximos do ponto central, atingindo o seu valor máximo nessa gama de valores.

A tabela 4.4 apresenta as duas variáveis de resposta calculadas pelas equações dos modelos anteriormente apresentados ($\eta_{0\text{calc}}$, τ_{calc}) e variáveis ajustadas ao modelo de Cross ($\eta_{0\text{exp}}$, τ_{exp}).

Tabela 4.4 Variáveis de resposta (viscosidade e tempo de relaxação) ajustadas às equações do modelo das superfícies de resposta e modelo de Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$).

FI	pH	η_0 (Pa.s) _{calc}	η_0 (Pa.s) _{exp}	τ (s) _{calc}	τ (s) _{exp}
0,15	4,5	0,710	0,938	0,097	0,109
0,65	4,5	0,980	0,949	0,139	0,134
0,15	9,5	0,587	0,615	0,081	0,079
0,65	9,5	0,215	0,619	0,052	0,056
0,4	7	1,256	1,119	0,194	0,228
0,4	7	1,256	1,278	0,194	0,134
0,4	7	1,256	1,222	0,194	0,118
0,05	7	0,566	0,523	0,112	0,050
0,75	7	0,493	0,535	0,122	0,123
0,4	3,47	1,047	1,047	0,106	0,111
0,4	10,54	0,416	0,150	0,032	0,017
0,1	4	0,411	0,241	0,049	0,033
0,3	6	1,229	1,314	0,184	0,202
0,5	8	1,030	0,395	0,166	0,080
0,6	10	0,200	0,198	0,033	0,026

Por comparação dos valores experimentais ajustadas ao modelo de Cross com as variáveis ajustadas à equação de superfície de resposta, é possível verificar, que na generalidade os modelos apresentam resultados próximos entre si, e como tal, prevêem bem os valores da viscosidade e do tempo de relaxação do polímero às varia condições de FI e pH.

De um modo geral é possível concluir que os parâmetros reológicos do biopolímero são fortemente afectados pela presença de pH alcalino.

Qualquer que seja a experiência efectuada, o biopolímero apresenta sempre um comportamento reofluidificante uma vez que o valor de 'm' é sempre superior a zero ($m=1-n$ e para $n=1$ é newtoniano).

4.2. CAPACIDADE DE ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÃO

Neste subcapítulo serão apresentados os resultados referentes à capacidade do EPS para a estabilizações de várias emulsões preparadas com diferentes teores O/A (20/80, 40/60, 60/40 e 80/20), em que se testaram várias concentrações de EPS na fase aquosa (0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5%).

Os EPS foram preparados à temperatura ambiente e sem adição de NaCl, nem correcção de pH. As emulsões foram analisadas após 24h de maturação em câmara refrigerada a 4°C.

4.2.1. Viscosidade aparente e propriedades viscoelásticas das soluções de EPS usadas na formação das emulsões

As curvas de viscosidade das soluções aquosas com diferentes percentagens de EPS usadas para formação das emulsões e os parâmetros da equação de Cross, encontram-se na figura 4.4 e na tabela 4.5, respectivamente.

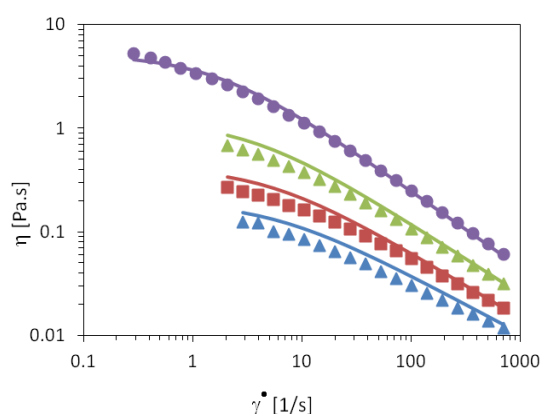


Figura 4.4 Curva de viscosidade das soluções de EPS (♦ 0,25%, ■ 0,5%, ▲ 1,0% e ● 1,5%) usadas para preparação das emulsões. As linhas contínuas ilustram o ajuste dos dados ao modelo de Cross.

Tabela 4.5 Parâmetros do modelo da Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) para as soluções de EPS a 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5% utilizados na formulações das emulsões.

EPS (%m/m)	pH	η_0 (Pa.s)	τ (s)	$m^{(*)}$	R^2
0,25	6,31	0,192±0,013	0,177±0,040	0,563±0,009	0,996
0,5	6,35	0,418±0,016	0,199±0,025	0,631±0,015	0,996
1,0	6,62	1,169±0,036	0,297±0,027	0,674±0,011	0,995
1,5	6,60	5,156±0,214	0,605±0,064	0,740±0,013	0,996

^(*) Parâmetro adimensional

A viscosidade aparente bem como os parâmetros da equação de Cross de viscosidade η_0 e tempo de relaxação, aumentam com o aumento da concentração de polímero na solução preparada. À medida que a concentração de polímero se torna mais elevada, as moléculas individuais começam a sobrepor-se, induzindo a formação de interações intermoleculares. Consequentemente ocorre um aumento da viscosidade da solução. Freitas et al. (2009b) verificou o mesmo comportamento quando fez variar a concentração de 0,2 a 1,5% do EPS produzido por *Pseudomonas oleovorans* com crescimento em glicerol.

Mais uma vez se verifica que os valores de $n=1-m$ são inferiores a 1, e que as curvas de escoamento apresentam diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação, indicando características reofluidificantes das soluções de polímero. Tal com explicado anteriormente, a diminuição de viscosidade com o aumento da taxa de escoamento é devida ao alinhamento das moléculas de polímero na direcção do escoamento. Contudo, é possível observar um decréscimo no índice de comportamento de fluxo do fluido n ($n=1-m$) com o aumento da concentração, o que indica que este aumento afasta cada vez mais o fluido de um comportamento Newtoniano ficando cada vez mais com características reofluidificantes.

É possível notar que, para a mesma concentração de polímero, os valores de viscosidade aparente apresentados na figura 4.4, são superiores aos apresentados na figura 4.1. Isto deve-se essencialmente ao facto dos polímeros usados serem provenientes de ensaios de produção em bioreactor diferentes, que originaram polímeros com características físicas e químicas diferentes.

Na figura 4.5 são apresentados os varrimentos de tensão e de frequência para as soluções de EPS a 1,0% e 1,5% m/m. Para ambos os casos é possível identificar uma zona de

viscoelasticidade linear para tensões abaixo de 5 Pa. Nessa zona, ambas as soluções apresentam um espectro mecânico com um comportamento normalmente atribuído a soluções poliméricas com cadeias de polímeros entrelaçadas, em que o módulo G'' predomina a baixas frequências, observando-se um “cross-over” a frequências mais elevadas.

O mesmo comportamento viscoelástico é apresentado por Freitas et al. (2011) aquando do estudo deste biopolímero rico em fucose.

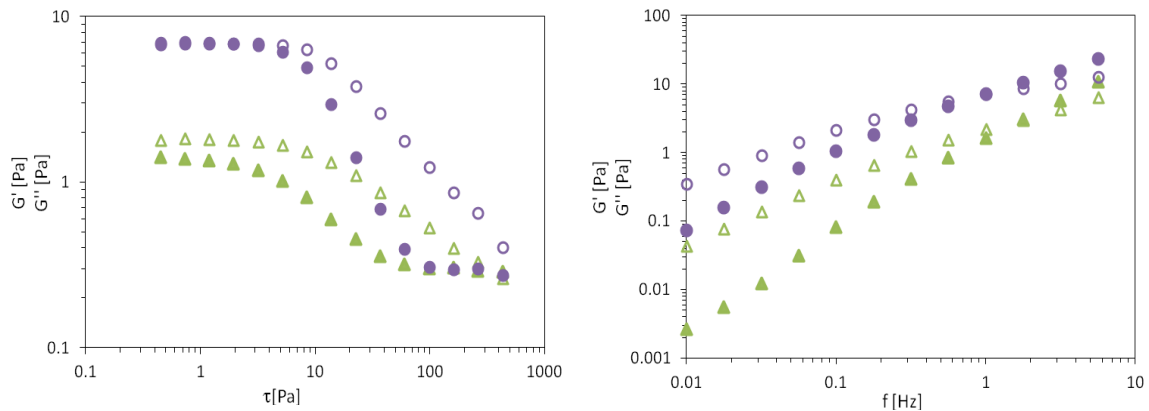


Figura 4.5 Variação do módulo de conservação G' (símbolos a cheio) e do módulo de dissipação G'' (símbolos a vazio) nas curvas de varrimento de tensão e frequência para soluções de EPS a 1% (\blacktriangle e \triangle) e 1,5% (\bullet e \circ) usados na preparação das emulsões.

Avaliando a variação dos módulos de dissipação G' e conservação G'' com a variação da frequência, é possível ver que o aumento da concentração de EPS na solução faz aumentar o valor dos módulos devido à estrutura ser mais entrelaçada quanto maior a concentração do polímero. Baías et al. (2005) ao estudar um biopolímero de origem fúngica observam esta mesma característica, ao verificar um progressivo aumento de ambos os módulos medidos na zona de viscoelasticidade linear, com o aumento da concentração do biopolímero estudado.

4.2.2. Propriedades das emulsões

4.2.2.1. Índice de emulsificação (E24h)

Nesta secção são apresentadas as emulsões produzidas com várias formulações a partir de diferentes concentrações de biopolímero. As emulsões foram preparadas com agitação em ultra-turrax a 5 minutos e 13500 rpm, e maturadas durante 24h em refrigeração a 4 °C.

Na figura 4.6 estão apresentadas as fotografias de todas as emulsões preparadas com as condições acima descritas.

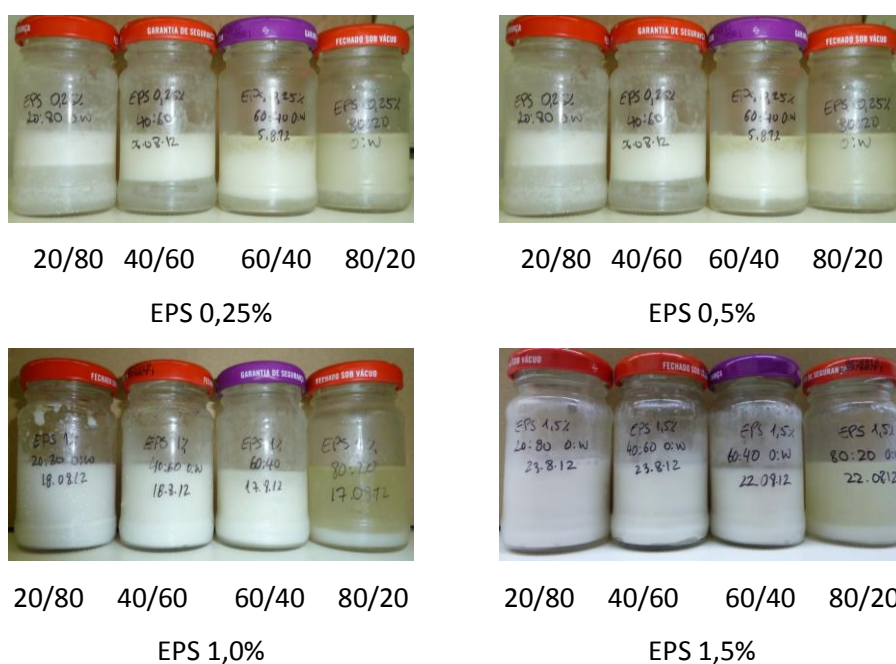


Figura 4.6 Aspecto das emulsões preparadas com cada formulação estudada

Os resultados referentes às percentagens de emulsão após 24h de estabilização são apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 Índice de emulsificação (E_{24})

EPS (%m/m)	O/A	E_{24}
0,25	20/80	31,3
	40/60	58,8
	60/40	73,5
	80/20	77,1
0,5	20/80	71,4
	40/60	57,1
	60/40	63,6
	80/20	71,4
1,0	20/80	100
	40/60	100
	60/40	100
	80/20	14,3
1,5	20/80	100
	40/60	100
	60/40	100
	80/20	22,9

Avaliando os valores de percentagem de emulsão formada e estabilizada após 24h de repouso (E_{24}), é possível observar que quando se usou soluções de EPS mais concentradas (caso de EPS a 1,0% e 1,5%) a percentagem de emulsificação foi de 100%, exceptuando no caso da mistura em que o óleo se encontra numa quantidade muito superior à água (80/20 O/A). Nesta proporção, para ambas as concentrações de polímero, houve uma separação praticamente total das fases. Para as proporções de 20/80, 40/60 e 60/40 O/A não se verificou qualquer separação de fases.

Quando se usou soluções de EPS menos concentradas (caso de EPS a 0,25% e 0,5%) a percentagem de emulsificação não foi total, situando-se entre cerca de 60% e 70% para a grande maioria dos casos. Nestes casos, a quantidade de polímero utilizado na preparação da emulsão não foi suficiente para formar uma mistura coloidal estável usando toda a massa de fase aquosa e de óleo usadas.

Verifica-se que para a formação de um sistema coloidal estável com a massa total de fase de óleo e aquosa adicionadas, é necessária uma concentração mínima de polímero na emulsão (massa polímero/massa de emulsão x 100) de: 0.8%, 0.6% e 0.4%, para as proporções de 20/80, 40/60 e 60/40 O/A, respectivamente.

É de salientar que na preparação das emulsões apresentadas foi utilizado o EPS, que não é um agente emulsionante por excelência, na medida em que, de acordo com a sua composição química base consistindo maioritariamente por monossacáridos, não apresentará propriedades anfifílicas. Porém, a análise química ao EPS usado, revelou a presença de proteínas numa concentração de cerca de 5 % m/m (Torres, 2012), provenientes da cultura bacteriana e não removidas totalmente durante o processo de purificação. Atribui-se a estas proteínas a capacidade de formação das emulsões, sendo que o EPS terá um papel mais proeminente como estabilizante, por aumentar a viscosidade da fase contínua.

4.2.2.2. Viscosidade aparente das emulsões

As curvas de escoamento de todas as emulsões preparadas, independentemente da percentagem de emulsificação obtida, são apresentadas na figura 4.7.

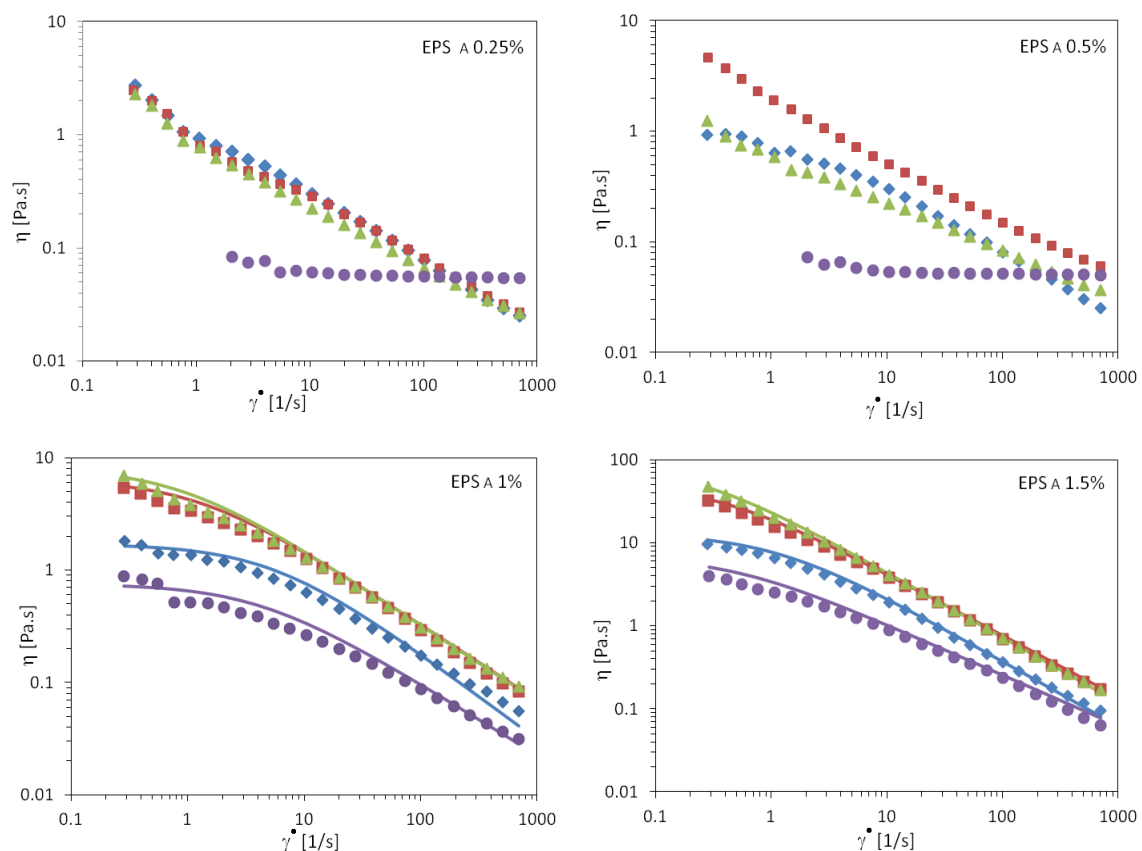


Figura 4.7 Curva de viscosidade das emulsões formadas (♦ 20/80, ■ 40/60, ▲ 60/40, ● 80/20) para cada concentração de EPS. As linhas ilustram o ajuste dos dados ao modelo de Cross.

A tabela 4.7 e a figura 4.8 apresentam a viscosidade aparente das suspensões e emulsões à taxa de deformação de $1s^{-1}$, bem como das soluções de EPS usadas.

Tabela 4.7 Viscosidade aparente à taxa de deformação de $1s^{-1}$ das suspensões e emulsões formas e das soluções de EPS usadas.

EPS (%m/m)	O/A	η_{EPS} (Pa.s)	η_{EMUL} (Pa.s)
0,25	20/80	0,113	0,929
	40/60		0,798
	60/40		0,768
	80/20		0,033
0,5	20/80	0,284	0,635
	40/60		1,889
	60/40		0,589
	80/20		0,028
1,0	20/80	0,682	1,370
	40/60		3,374
	60/40		3,797
	80/20		0,512
1,5	20/80	3,062	6,537
	40/60		15,70
	60/40		20,01
	80/20		2,526

Verifica-se que praticamente todas as suspensões e emulsões preparadas apresentam um comportamento reofluidificante, independentemente da concentração de polímero usada e da razão O/A, excepto no caso das suspensões com O/A de 80/20 para as concentrações de 0,25% e 0,5%, as quais apresentam um comportamento Newtoniano.

Os resultados referentes aos parâmetros da equação de Cross para as curvas de escoamento em que é aplicável encontram-se resumidos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 Valores dos parâmetros do modelo de Cross (assumindo $\eta_{\infty} \ll \eta_0$ e $\eta_{\infty} \ll \eta_a$) para as emulsões formadas

EPS (%m/m)	O/A	η_0 EMUL (Pa.s)	τ (s)	$m^{(*)}$	R^2
1,0	20/80	1,692±0,080	0,182±0,029	0,766±0,046	0,968
	40/60	6,400±0,551	0,822±0,218	0,672±0,034	0,994
	60/40	8,132±0,465	1,164±0,177	0,676±0,014	0,996
	80/20	0,750±0,057	0,244±0,064	0,635±0,037	0,991
1,5	20/80	13,026±11,894	0,922±0,055	0,785±0,014	0,986
	40/60	53,197±6,068	3,026±0,712	0,744±0,016	0,998
	60/40	89,788±18,759	4,598±1,744	0,786±0,023	0,998
	80/20	6,803±0,944	2,173±0,928	0,610±0,036	0,996

(*) Parâmetro adimensional

O facto de tanto os valores de $n=1-m$ serem inferiores a 1, como as curvas de escoamento apresentarem diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação, indica características reofluidificantes. A diminuição de viscosidade será devida ao fraccionamento do agregado de gotas de óleo com consequente quebra da estrutura organizada das emulsões que começa a formar camadas coincidente com o plano de corte, oferecendo assim menor resistência. Vianna-Filho et al. (2012) apresentam emulsões com igual comportamento não-Newtoniano, ao estudar emulsões com diversos polissacáridos (Xyloglucan, sodium hyaluronate, xanthan gum, Fucogel) a 0,15% m/m.

Os resultados de índice de emulsificação E_{24} , obtidos por Freitas et al. (2011) para emulsões de 60/40 O/A, com solução de EPS rico em fucose a 0,5%, são de 60%, estando bastante similares aos apresentados neste trabalho para as mesmas condições ($E_{24}=63\%$). Os mesmos autores num estudo de emulsificação com EPS produzido por *Pseudomonas* (2009b) apresentam E_{24} de 20% quando mistura num rácio de 60/40 óleo de girassol com EPS de concentração 0,8% (m/m).

No geral, quanto maior a percentagem de polímero usada na formação das emulsões, maior é o valor da viscosidade dessas emulsões.

4.2.2.3. Propriedades viscoelásticas das emulsões

Os testes oscilatórios fornecem importantes informações acerca dos parâmetros reológicos G' e G'' , e das suas variações com tensão aplicada ou com a variação da frequência aplicada nas emulsões estudadas.

Nas figuras 4.9 e 4.10 pode-se avaliar o efeito da percentagem de biopolímero usado e o efeito da composição O/A (para cada percentagem de EPS), sobre o comportamento viscoelástico das emulsões de modo a avaliar os módulos de conservação (ou módulo elástico – G') e o módulo de dissipação (ou módulo viscoso – G'').

▪ Varrimento de tensão

Os ensaios de varrimento de tensão permitem determinar a estabilidade da amostra quando sujeita a tensões crescentes, e fornece informações sobre a região de viscoelasticidade linear. Será tendo em conta esta zona de viscoelasticidade linear que se escolherá a tensão a aplicar nos ensaios de varrimento de frequência. Os resultados obtidos para as emulsões em estudo são apresentados na figura 4.8

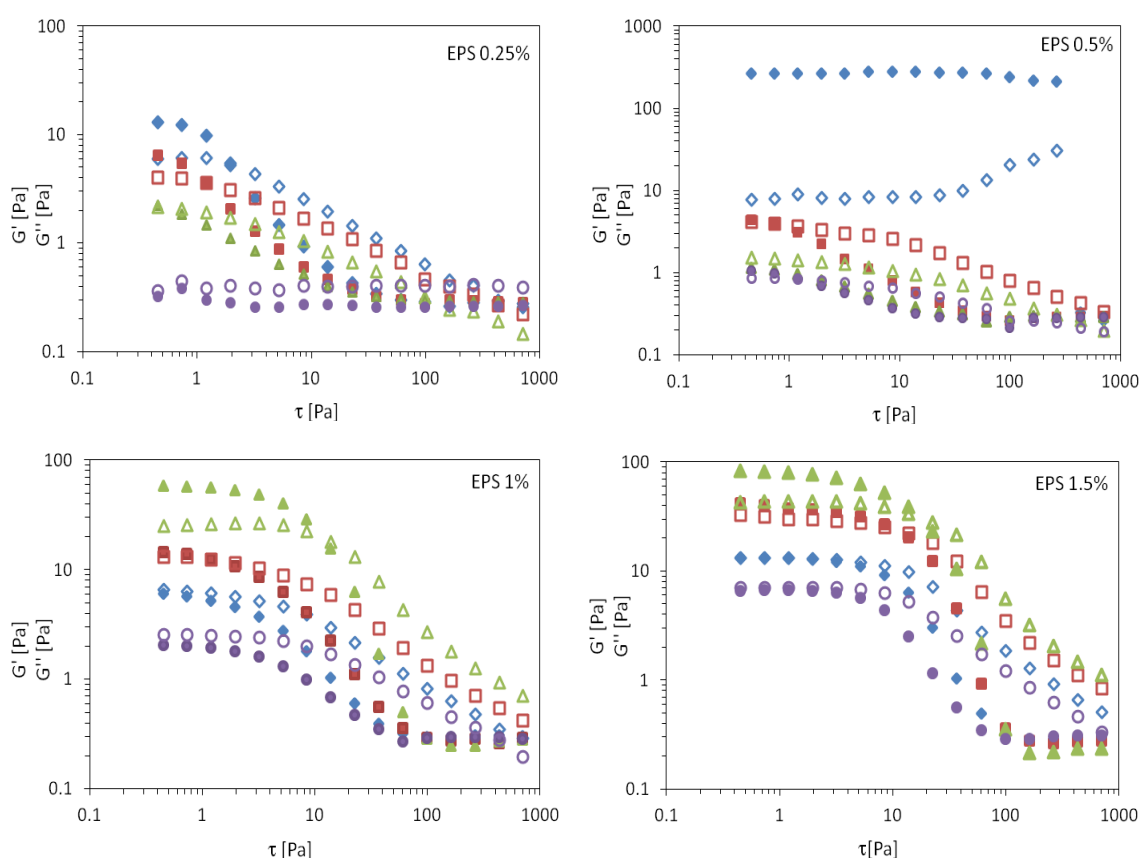


Figura 4.8 Variações do módulo de conservação G' (símbolos a cheio) e do módulo de dissipação G'' (símbolos a vazio) nas curvas de varrimento de tensão das suspensões e

emulsões (◆ e ◇ 20/80, ■ e □ 40/60, ▲ e △ 60/40, ● e ○ 80/20) obtidas a partir de diferentes concentrações de EPS.

Para as emulsões obtidas com menores concentrações de polímeros (0,25% e 0,5%), não se verifica um primeiro patamar correspondente a baixa deformação quando aplicada uma tensão baixa, logo é possível inferir que na gama de tensões testadas o sistema já estará na zona de viscoelasticidade não linear.

No caso de varrimento de tensão às emulsões preparadas com polímero de 1,0% e 1,5%, é possível visualizar um patamar a baixas tensões onde não há variação significativa dos módulos G' e G'' , no qual se inclui a tensão a 1 Pa, tensão esta a ser usada para os ensaios de varrimento de frequência. Este patamar evidencia uma emulsão mais coesa tal como já se tinha verificado com as curvas de escoamento apresentadas no subcapítulo 4.2.2.2.

▪ Varrimento de frequência

Os varrimentos de frequência das emulsões preparadas encontram-se na figura 4.9.

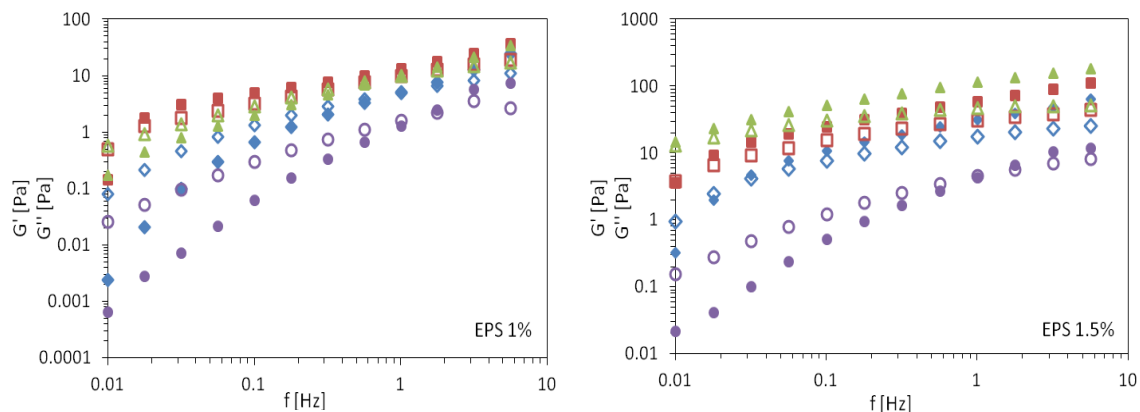


Figura 4.9 Variações do módulo de conservação G' (símbolos a cheio) e do módulo de dissipação G'' (símbolos a vazio) nas curvas de varrimento de frequência das suspensões e emulsões (◆ e ◇ 20/80, ■ e □ 40/60, ▲ e △ 60/40, ● e ○ 80/20) obtidas a partir de diferentes concentrações de EPS

Para o caso das emulsões formadas com 1,0% de EPS, verifica-se que para emulsões com mistura 40/60 e 60/40 O/A, os módulos de conservação e dissipação estão aproximados indicando que cerca de metade da energia aplicada é recuperada e a outra parte é dissipada. Contudo, a composição 40/60 tem um comportamento ligeiramente mais elástico ($G' > G''$), e a

emulsão 60/40 um comportamento ligeiramente mais viscoso ($G'' > G'$). Para as composições restantes (20/80 e 80/20 O/A) o módulo de dissipação é maior que o módulo elástico ($G' < G''$) indicando por isso que a energia é dissipada e que a deformação é viscosa e portanto não recuperável.

No caso de emulsões de 1,5% de EPS, estas apresentam no geral valores mais elevados de ambos os módulos, em relação aos valores encontrados com a concentração de 0,5% de EPS, indicando uma estrutura com interações mais fortes. Estes valores estão de acordo com as curvas de escoamento, que apresentam maior viscosidade quando a concentração de 1,5% foi usada, qualquer que seja a mistura O/A estudada.

Mais uma vez, quando a concentração de 1,5% foi usada, as misturas com fases hidrofílica – hidrofóbicas de 40/60 e 60/40 apresentam um comportamento diferente das emulsões com fases muito díspares (20/80 e 80/20). Para o primeiro conjunto de emulsões o módulo de conservação é predominante em relação ao de dissipação ao longo de todo o espectro de frequência estudada ($G' > G''$), dando a entender uma maior estruturação da emulsão.

Um comportamento semelhante às emulsões mais estáveis estudadas neste trabalho foi apresentado por Vianna-Filho et al. (2012) no estudo das características reológicas de emulsões O/A com diversos polissacarídeos (Xyloglucan, sodium hyaluronate, xanthan gum, Fucogel). Este autor verifica que para todas as emulsões G' foi superior a G'' apresentando um comportamento predominantemente elástico com aproximação a uma estrutura semelhante a gel. O mesmo estudo conclui que a resposta reológica das emulsões depende do tipo de polissacárido usado.

De acordo com Myers (1999) citado por Vianna-Filho et al. (2012), além do espessamento contínuo fase, há também outros factores que podem alterar a reologia dos sistemas das emulsões. Interações entre surfactantes e polissacarídeos podem afectar as propriedades macroscópicas desses sistemas. Estas interações podem ocorrer por mecanismos distintos que dependem da composição química da cadeia de polímero, a natureza do surfactante e das cargas eléctricas envolvidos.

Para melhor compreensão da estrutura das emulsões formadas e da capacidade de estabilização do biopolímero em estudo, as emulsões deveriam ter sido armazenadas durante

um período de tempo mais alargado, para se avaliar a existência ou não de alterações na estrutura interna da rede durante a sua maturação.

A equação 4.1 foi ajustada aos valores experimentais dos espectros mecânicos de modo a avaliar a dependência dos módulos G' e G'' com a variação da frequência, através do cálculo do expoente β (Valdez et al, 2006, citado por Torres, 2012):

$$G'(G'') = \alpha \cdot f^\beta \quad (\text{Equação 4.1})$$

Os valores obtidos estão apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9 Valores de β da regressão não-linear power law, para as diferentes emulsões estudadas

O/A	0,25%		0,5%		1,0%		1,5%	
	$\beta (G')$	$\beta (G'')$	$\beta (G')$	$\beta (G'')$	$\beta (G')$	$\beta (G'')$	$\beta (G')$	$\beta (G'')$
20/80	0,1815	0,2091	2,0059	0,9264	0,9754	0,5908	0,4961	0,3219
40/60	0,3418	0,3453	0,8316	0,4809	0,4782	0,4611	0,3972	0,2688
60/40	1,1018	0,5929	1,7224	0,9055	0,7444	0,4725	0,3305	0,1522
80/20	2,0411	1,3700	1,6869	0,9051	1,5258	0,8326	0,8831	0,5387

β corresponde ao declive da zona recta da curva de G' (G'') em função de f (Hz). Quanto maior for o declive maior será a influência da frequência sobre os módulos elástico e viscoso. Quanto maior esta influência, significa que as moléculas do fluido desentrelaçam-se mais facilmente sob a variação da frequência, indicando menor comportamento elástico. Caso o declive seja baixo, indica uma maior resistência mecânica, e neste caso a amostra tenderá para um comportamento próximo de um gel.

Verifica-se que de uma forma geral, os módulos G' e G'' mais influenciados pela frequência (declive mais elevados) percentem às emulsões que apresentam soluções de ESP mais baixas.

Menor variação de G' e G'' com a variação da frequência corresponde às emulsões constituídas com polímero mais concentrado. Esta observação poderá estar relacionada com a maior presença deste componente na fase aquosa, que irá conferir maior estruturação às emulsões formadas, sendo estas mais resistentes ao stress mecânico. Tal como anteriormente, estas emulsões são as que apresentam maiores valores de viscosidade e de módulos elástico e viscoso.

4.2.2.4. Avaliação da estabilidade das emulsões sob centrifugação

A avaliação da estabilidade foi também feita através de ensaios de centrifugação de parte da emulsão, durante 15 min a 3805 xg. Pretendia-se com estes ensaios avaliar a separação das fases e quantificar a percentagem de separação.

Na figura 4.10 estão algumas fotografias tiradas após os ensaios de centrifugação, para emulsões com EPS a 1,0% (fotos de cima) e emulsões com EPS a 1,5% (fotos de baixo).

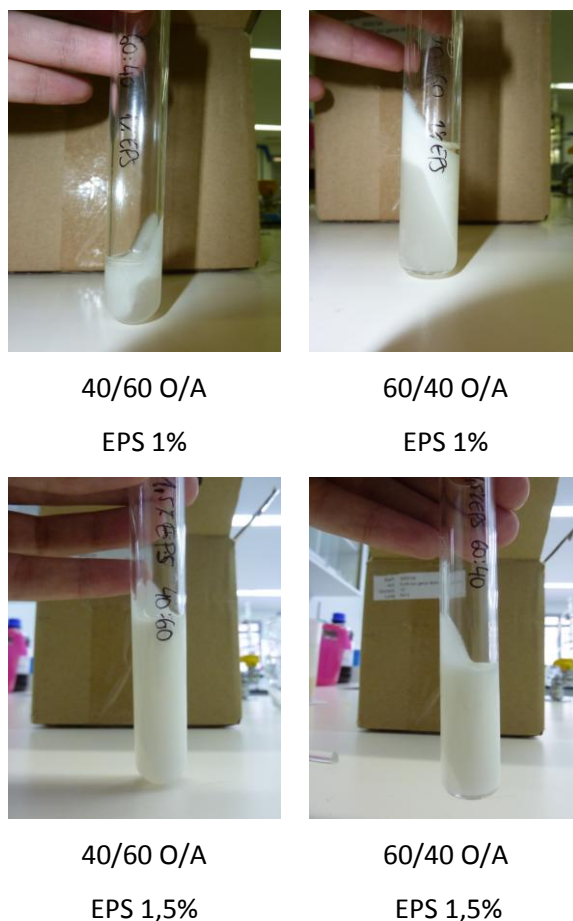


Figura 4.10 Aspecto das emulsões após centrifugação

Em todos os ensaios com centrifugação que se fizeram, a separação não foi homogénea impossibilitando a quantificação da fase separada. De qualquer modo, foi possível observar que essa separação não foi total, dando a entender uma boa estabilidade das emulsões à força centrífuga estudada.

Foi possível observar que à concentração de 1,0% existe alguma separação não sendo no entanto possível fazer a quantificação. Para emulsões com EPS a 1,5%, verifica-se pouca ou

nenhuma separação. As concentrações de 0,25% e 0,5% não foram avaliadas quanto à sua estabilidade.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados apresentados no capítulo 4 deste trabalho permite obter conclusões importantes acerca das propriedades reológicas do biopolímero em estudo e das emulsões estabilizadas pelo mesmo.

A partir do estudo da avaliação da capacidade espessante verificou-se, como era esperado, que quanto maior a concentração do polímero, maior a sua viscosidade. Contudo, com a viscosidade das soluções de polímero diminuiu com o tempo, qualquer que fosse a concentração em estudo, uma vez que possivelmente o polímero não está estabilizado do ponto de vista enzimático. Verificou-se, porém, a manutenção do comportamento reofluidificante.

A partir do estudo do efeito da força iônica e do pH na viscosidade aparente, usando um desenho experimental rotacional composto e a metodologia de superfície de resposta, observou-se que o valor da viscosidade do primeiro patamar Newtoniano atingiu valores mais elevados na gama de pH entre 3 e 8, e de força iônica entre 0,1 e 0,5 M.

A capacidade estabilizante do biopolímero na formulação de emulsões com óleo de girassol foi estudada usando soluções aquosas com 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de polímero, e razões óleo/água (O/A) de 20/80, 40/60, 60/40 e 80/20.

Verificou-se a formação e estabilização de emulsões com toda a massa de óleo e fase aquosa usadas, apenas quando se usou soluções de EPS mais concentradas (1,0% e 1,5%). Para estas emulsões, a percentagem de emulsificação foi de 100% (exceptuando na mistura 80/20 O/A – neste caso não foi formada emulsão). Para soluções de EPS menos concentradas (EPS a 0,25% e 0,5%) não se verificou uma emulsificação total das fases, sendo que a percentagem de emulsificação situou-se entre cerca de 60% e 70% para a grande maioria dos casos.

Para cada solução de EPS as emulsões mais estruturadas (G' e G'' e maiores e valores de β menores) são as mesmas que apresentam maiores viscosidades: O/A = 60/40 para 1,0% e 1,5% de EPS. De todas as emulsões estudadas, a mais estruturada é a que apresenta na fase aquosa maior concentração de EPS (1,5%) com razão O/A de 60/40.

As emulsões obtidas não encontram aplicação em produtos que exigem um grau de estruturação interna elevada (maioneses p.e.), mas podem ser aplicadas para aumentar a interface água/óleo, para promover, por exemplo, reacções químicas nessas interfaces (Freitas et al., 2009b).

6. SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

Atendendo a todos os resultados apresentados ao longo deste trabalho e às principais conclusões anteriormente expostas, verifica-se que muitos outros estudos ficaram por realizar.

Esta situação deixa em aberto uma série de trabalhos futuros, dos quais se destacam:

- Realização de um desenho de experiência a três variáveis (pH, FI e T) de modo a avaliar a evolução do biopolímero nas diversas condições bem como a interação entre elas.
- Com a emulsão 1,5% de EPS e 60/40 O/A adicionar espessantes e otimizar condições de emulsificação.

Estes estudos deverão ter em conta que a capacidade de formação e estabilização de emulsões, sob diferentes condições, depende, não só do emulsificante usado, como também do composto hidrofóbico empregue (Freitas et al. 2011).

BIBLIOGRAFIA

Alves, V. D., Freitas, F., Torres, C. A. V., Cruz, M., Marques, R., Grandfils, C., Gonçalves, M. P., Oliveira, R. & Reis, M. A. M. (2010). Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. *Carbohydrate Polymers*, 81, 758-764

Bais, D., Trevisan, A., Lapasin, R., Partal, P. & Gallegos, C. (2005). Rheological characterization of polysaccharide-surfactant matrices for cosmetic O/W emulsions. *Colloid and Interface Science*, 290, 546-556

Boels I.C., Kranenburg R.V., Hugenholtz J., Kleerebezem M. & de Vos W.M (2001). Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 723-732

Calero, N., Munoz, J., Cox, P. W., Heuer, A. & Guerrero, A. (2013). Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. *Food Hydrocolloids*, 30, 152-162

Castro, A. G., Covas, J. A. & Diogo, A. C. (2001). Reologia e suas aplicações industriais. Eds. Instituto Piaget. p. 16 – 29 e 135 – 141

Cescutti P., Kallioinen A., Impallomeni G., Toffanin R., Pollesello P., Leisola M. & Eerikäinen T. (2005). Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus*. *Carbohydrate Research*, 340, 439-447

Cruz, M., Freitas, F., Torres, C. A. V., Reis, M. A. M. & Alves, V. D. (2011). Influence of temperature on the rheological behavior of a new fucose-containing bacterial exopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 695-699

Diaz, P. S., Vendruscolo, C. T. & Vendruscolo, J. L. (2004). Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, 25, 15-28.

Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., et al. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*, 100, 859-865

Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R. & Reis, M. A. M. (2009). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, 78, 549–556

Freitas, F., Alves, V. D., Torres, C. A.V, Cruz, M., Sousa, I., Melo, M. J., Ramos, A. M. & Reis, M. A.M. (2009). Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. *Carbohydrate Polymers*, 83, 159–165

Kumar, A. S., Mody, K. & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Basic Microbiology*, 47, 103-117

Landon, R. S., Law, R. C. S. & Webb, C. (1993). Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512(F). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 251-257.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, A., Pettersen, J. & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42, 3–40

Melo, E. (2007). Estabilidade de emulsões de petróleo em sistemas pressurizados. Tese de Mestrado. Universidade Tiradentes

Raymundo, A. (1999). Estudo e optimização da capacidade emulsionante de isolados proteicos de *L. albus*. Tese de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa

Santos, R. L. (2011). Avaliação da produção de algionato por *pseudomonas mendocina*. Tese de Mestrado. Universidade de Santa Catarina.

Torres, C. (2012). Engineering of Bacterial Exopolysaccharides: From Synthesis to Properties. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa

Vanhooren, P.T. & Vandamme, E. J. (1999). L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 479-497

Vianna-Filho, R. P., Petkowicz, C. L. O. & Silveira, J. L. M. (2013). Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 93, 266-272